179　恐怖記憶の基盤となる全脳ダイナミクスの解明	宮脇　寛行

【目的】げっ歯類を用いた恐怖記憶の形成と消去は、ヒトにおける外傷後ストレス障害の発症と治療の動物モデルとして広く研究されている。恐怖記憶には扁桃体が深く関わることが知られているほか、近年の研究により海馬や前頭前野の関与も明らかとされ、複数の脳領域が協調してミリ秒レベルでの活動パターンを制御することにより神経ネットワークを変化させることで記憶が固定化されている可能性が示唆されている。しかし、いつ、どこで、どのような神経活動が見られ、どのような脳領域間および神経細胞間の相互作用が恐怖記憶の形成や消去に必要なのかは不明である。

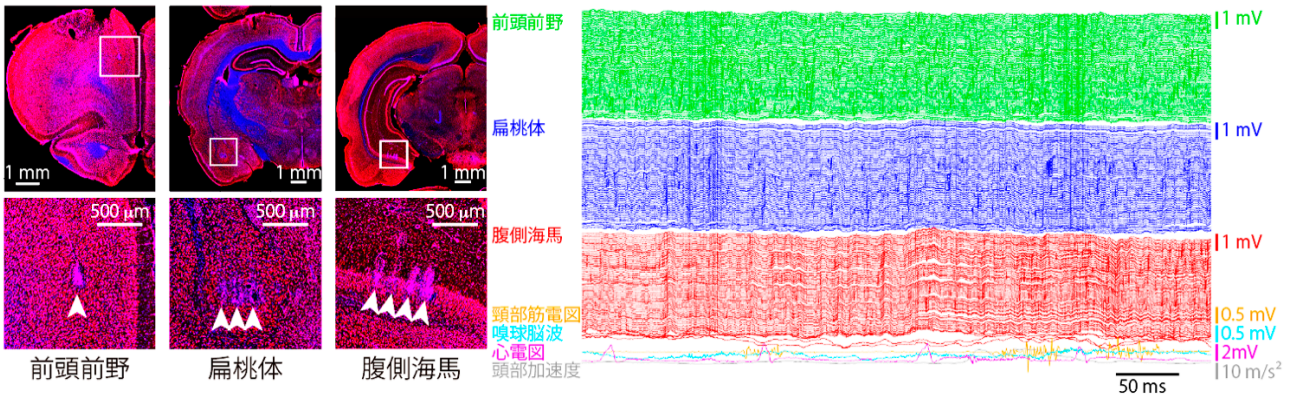
この点を明らかにするためには、恐怖記憶に関わる複数の脳領域から多数の神経細胞の活動を同時に、ミリ秒レベルの時間分解能で、記憶の形成前から消去後まで連続して記録することが必要である。そこで本研究ではまず、恐怖記憶の形成前から消去後まで連続して、扁桃体、前頭前野、腹側海馬の 3 領域から多数の神経細胞の活動を記録する手法の開発を目的とした。さらに、恐怖記憶の形成や消去に伴うこれらの領域の神経細胞の活動変化の解明を目指した。

【方法】3 つのシリコン製多点微小電極を同時に用いることにより、自由に行動しているラットの扁桃体、前頭前野、腹側海馬の 3 領域から高い時間分解能をもって多数の神経細胞の活動を記録した。さらに、眼瞼内に留置した電極からの電流パルス提示によって恐怖条件付け学習を行うことにより電気的ノイズを低減し、恐怖記憶の形成前から消去後までの神経活動を連続して記録した。同時に動物の行動や心拍、嗅球の活動を記録し、これらをもとにラットが恐怖を感じすくみ反応を呈しているタイミングを検出した。これらのデータを用い、情報理論を応用することによりすくみ反応の有無について各細胞の 1 つのスパイクがもつ情報量を計算し、その相関や変化を異なる脳領域間で比較を行った。

【結果】複数のシリコン製多点微小電極を用いた超大規模電気生理学と眼瞼内電極による低ノイズ電気刺激法を組み合わせるにより、複数の脳領域の多数の神経細胞の活動を恐怖記憶の形成前から消去後まで連続して高い時間分解能で記録する手法を確立することができた。

さらに、すくみ反応の有無に対する各細胞の 1 つのスパイクあたりの情報量を記憶プロセスの異なるタイミングで比較したところ、領域を問わず全体として情報量は正の相関を示す傾向が認められた。一方で個々のスパイクがもつ情報量の変化については領域ごとに異なるパターンが見られた。この結果は、1 つの記憶が複数の脳領域において異なる形でコードされている可能性を示唆している。

超大規模電気生理学による前頭前野・扁桃体・腹側海馬からの同時記録



179. 恐怖記憶の基盤となる全脳ダイナミクスの解明

宮脇　寛行

大阪市立大学 大学院医学研究科 神経生理学教室

Key words：恐怖記憶，超大規模電気生理学，シングルユニット記録、スパイク情報量

緒　言

げっ歯類を用いた恐怖記憶の形成と消去は、ヒトにおける外傷後ストレス障害の発症と治療の動物モデルとして広く研究されている。恐怖記憶には扁桃体が深く関わることが知られているほか、近年の研究により海馬や前頭前野も不可欠であることが示唆されている。また、恐怖記憶の固定には睡眠時におこる脳領域間の相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。脳領域間の相互作用には様々な脳波パターンが関わるが、中でも 100 ミリ秒程度の一過的な活動パターンであるリップル振動は睡眠中に繰り返し観察され、覚醒時の発火パターンがミリ秒レベルに圧縮された形で再現されている［1］ことや脳領域間の同期した活動亢進が見られることから、記憶の固定に重要な役割を果たしていると考えられている。また、睡眠時には数時間のタイムスケールで海馬の神経活動が徐々に減弱してゆくが、リップル振動はこの変化にも関与している［2］。これらの結果は、複数の脳領域が協調してミリ秒レベルでの活動パターンを制御することにより神経ネットワークを変化させ、記憶の固定化が実現されている可能性を示唆している。しかし、いつ、どこで、どのような神経活動が見られ、どのような脳領域間および神経細胞間の相互作用が恐怖記憶の形成や消去に必要なのかは不明である。

この点を明らかにするためには、恐怖記憶に関わる複数の脳領域から多数の神経細胞の活動を同時に、ミリ秒レベルの時間分解能で、記憶の形成前から消去後まで連続して記録することが必要である。そこで本研究ではまず、恐怖記憶の形成前から消去後まで連続して、扁桃体、前頭前野、腹側海馬の 3 領域から多数の神経細胞の活動を記録する手法の開発に取り組んだ。さらに、恐怖記憶の形成や消去に伴い、これらの領域の神経細胞の活動がどのように変化するかを検討した。

方　法

すべての実験は大阪市立大学動物実験委員会から承認を受けた上で、日本学術会議が作成した「動物実験の適切な実施に向けたガイドライン」等に準拠した大阪市立大学動物実験管理規程に則り行った。

1.　手術

実験にはラット（Long Evans 系統オス、10～16 週齢、n = 8）を用い、イソフルラン麻酔下で心電図記録電極、嗅球脳波記録電極、頸部筋電図記録電極、刺激提示用眼瞼電極の設置、ならびに前頭前野、扁桃体、腹側海馬へのシリコン製多点微小電極（NeuroNexus 社製 Buzsaki64sp、図 1a）の刺入を行った。心電図ならびに嗅球脳波の記録は Okada ら［3］の方法を、刺激提示用眼瞼電極の留置は Blair ら［4］の方法を、頸部筋電図ならびにシリコン製多点微小電極の刺入は Miyawaki ら［2］の方法をもとに適宜改変を加えて行った。

2. 行動実験

行動実験は基底状態、恐怖条件付け、文脈保持、手掛り保持および消去学習、消去保持の 5 つの行動課題で構成した。それぞれの行動課題は 150 分間隔で実施し、課題時以外はラットを同じ部屋に置いたホームケージへ戻した。行動課題は円形および方形の 2 種類の行動箱を用いて行った。

基底状態はラットを方形行動箱に導入し、4 分間の自由探索の後、30 秒間のピップ音（5 kHz、74 dB、250 ms オン、750 ms オフ)を 210±20 秒の間隔で 4 回聞かせて記録した。恐怖条件付けは、円形行動箱にラットを入れ自由探

索を 4 分間行わせた後、ピップ音を 30 秒間聞かせた直後に電気パルス（2 ms、4.6 mA）を 8Hz で 2 秒間、両側に提示することで行った。ピップ音と眼瞼刺激の組み合わせ提示は 210±20 秒の間隔で 12 回行った。文脈保持は円形行動箱にラットを再び導入し、4 分間の自由探索を行わせて記録した。手掛り保持課題は方形行動箱にラットを導入し、4 分間の自由探索後に 30 秒のピップ音を 210±20 秒の間隔で 8 回聞かせ記録した。その後、30 秒のピップ音を 90±20 秒間隔で 32 回聞かせ、消去学習を行わせた。消去保持は、方形行動箱にラットを導入し、4 分間の自由探索の後に 30 秒のピップ音を 210±20 秒の間隔で 8 回聞かせて記録した。

3. 電気生理学記録

電気生理学記録は最初の行動課題の開始 150 分前から、最後の行動課題の終了 150 分後まで、ラットがホームケージに滞在している間も含めて連続して行った。記録に際しては心電図、筋電図、嗅球脳波記録用のコネクターならびにシリコン製多点微小電極のコネクターに前置増幅装置を接続し、3.6 m のケーブルを介して Intan Technologies 社製 256 チャネル記録装置へと接続した。open ephys GUI（http://www.open-ephys.org/）を用い、0.1 Hz～7.6 kHz の広帯域シグナルをサンプリング周波数 20 kHz で記録した。天井に設置したビデオカメラで動物の行動も同時に記録した。

4. 組織学解析

記録終了後直ちにラットをイソフルラン麻酔し、各電極に定電流を印加することで記録部位をマーキングした。マーキング後 12～36 時間後にパラホルムアルデヒド（4%）を用いて灌流固定を行い脳標本を取り出した。脳標本はビブラトームを用いて 50 μm 厚の冠状切片とし、DAPI 染色ならびに蛍光ニッスル染色を行い、共焦点顕微鏡（Carl Zeiss LSM-700）あるいは蛍光顕微鏡（Keyence BZ-X800）で観察した。

5. データ解析

記録した広帯域シグナルからの単一神経細胞の活動に由来するスパイクの検出とスパイクソーティングには kilosort［5］を用いた。刺激提示前後 2 ミリ秒の間に検出されたスパイクはノイズとして除外し、phy（https://github.com/kwikteam/phy）を用いて目視によりスパイクソーティングの修正を適宜行った。続く解析には、単離された神経活動のうち Isolation distance［6］が 15 以上かつ Inter-Spike Interval Index［7］が 0.1 以下の細胞のみを用いた。

ラットの睡眠・覚醒は TheStateEditor(https://github.com/buzsakilab/TheStateEditor)を用いて、前頭前野および海馬の局所電位と頸部筋電図に基づき目視で判別を行った。動物のすくみ反応については、覚醒時の嗅球脳波、頸部筋電図、頭部加速度、心拍数をもとに検出した。各細胞の 1 つのスパイクが持つすくみ反応の有無に対する情報量 Spike Information（SI）は Skaggs ら［8］の手法を援用して計算した。具体的には以下の式に基づいて計算した。

$$SI = \sum_{i=0}^{1} \left(\frac{F_i}{F} \cdot log_2 \frac{F_i}{F} \cdot p_i \right)$$

ここで、Fは解析対象全体の平均発火頻度、F_iおよび P_iは状態 i（i=0:すくみ反応時、i=1:非すくみ反応時）の平均発火頻度およびその状態の現れる確率である。SI はそれぞれの行動課題で個別に計算した。ただし、手掛り保持および消去学習課題は他の課題に比べて長いため、3 つの等しい時間間隔に区切って計算した。異なる 2 つの行動課題間情報量の差はの p 値は Bonferroni の補正を施した Wilcoxon の符号順位和検定によって計算した。

結果および考察

1. 超大規模電気生理学記録による記憶プロセス横断的な神経活動記録

3 つのシリコン製微小多点電極を用い、自由に行動しているラットの恐怖条件付け前から消去学習後までの神経活動を連続して記録した（図 1ab、詳細は「方法」を参照）。これまでに 8 匹のラットで記録を試み、それぞれについて記録部位の検討を行った（図 1c）結果、7 匹は前頭前野、扁桃体、腹側海馬体からの記録であることが確認できた。そこで解析はこの 7 匹を対象として行った。例として図 1d に示したトレースと同程度の高品質な記録を条件づけ前から消去後まで通して得ることができた。電気刺激提示時も、ショックの直後 5 ミリ秒ほどの間を除いて神経活動の解析が可能なレベルの記録を得ることができた。これにより、当初の目標であった「扁桃体、前頭前野、腹側海馬の 3 領域から

多数の神経細胞の活動を高い時間分解能で連続記録する手法の確立」を達成することができた。

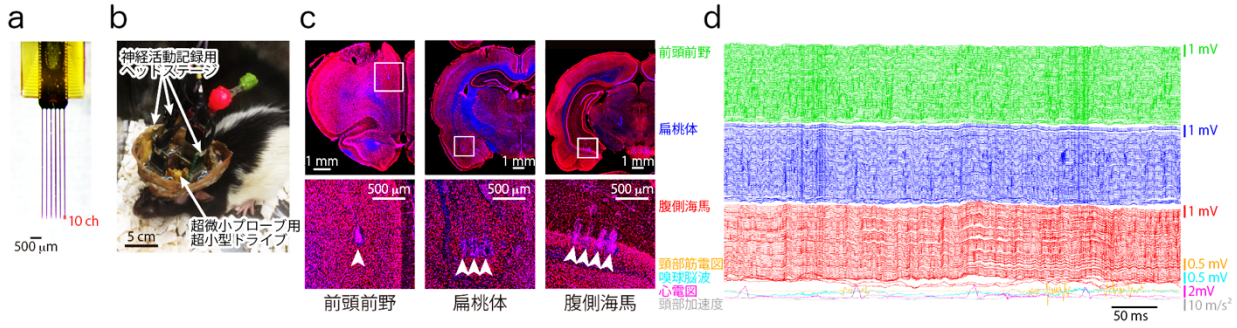


図 1. 超大規模電気生理学記録による 3 領域同時記録

a) シリコン製微小多点電極。赤色で示した 200 μm の部分に 10 チャネルの記録部位が集積されている。

b) シリコン製微小多点電極を 3 つ同時に用いた超大規模電気生理学記録を行っている様子。同時に頸部筋電図、嗅球脳波、心電図、頭部加速度を記録しているほか、ビデオ録画による位置検出のための LED も搭載している。

c) 神経活動の記録部位。前頭前野、扁桃体、腹側海馬に記録部位があることが確認できる（白色矢頭）

d) 前頭前野、扁桃体、腹側海馬からの同時記録例。この記録から個々の神経細胞の活動を抽出することにより 300 個程度の神経細胞の活動を同時に解析することができる。同時に頸部筋電図、嗅球脳波、心電図、頭部加速度を計測しており（下部の 4 トレース）、動物の行動と生理反応から記憶を評価することができる。

2. 記憶プロセスに伴う神経発火のもつ情報量の変化

続いて、各領域の記憶情報表現の違いを解析するため、まず各細胞がラットのすくみ反応の有無についてのスパイク 1 回あたりの情報量をそれぞれの行動課題中について計算した。次に、それぞれの細胞で異なる行動課題中の情報量に見られる相関と情報量の増減を計算した（図 2）。全体として情報量は正の相関を示す傾向が認められたが、基底状態との間の相関にはほとんど有意なものが見られなかった。これは、恐怖条件付によって新たな情報表現が獲得されたことを示唆している。また、情報量の増減については、脳領域ごとに異なった傾向が見られた。興味深いことに、扁桃体外側核と腹側海馬 CA1 領域では恐怖条件付け後、文脈保持および手掛り保持について情報量の有意な増加が見られたが、他の脳部位では有意な変化が無いか、むしろ有意な減少が認められた。これらの結果は、1 つの記憶が脳領域ごとに異なった形でコードされていることを示唆している。

今後、個々の神経細胞のレベルで詳細に見た場合の情報表現様式の変化や、それぞれの行動課題の間のどのような活動パターンが情報表現の変化を引き起こすのかといった点について、さらなる解析を進めていきたいと考えている。

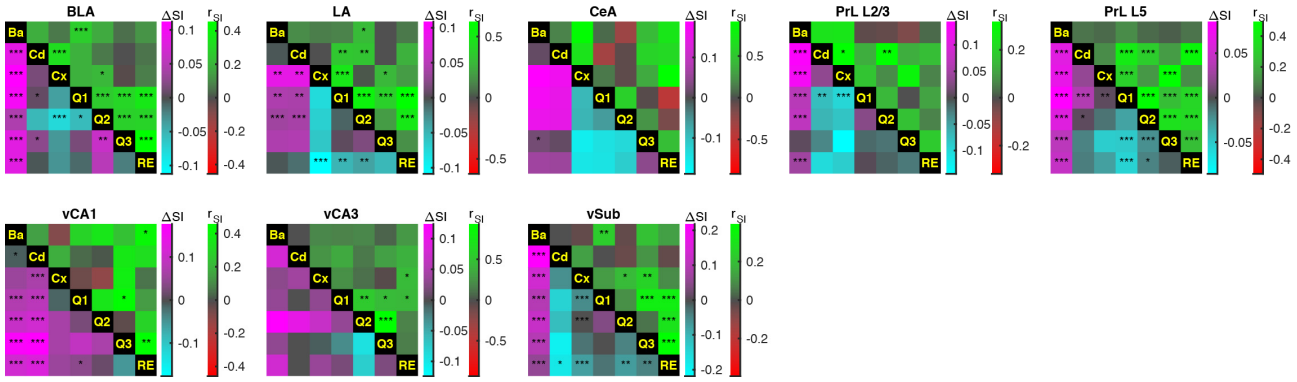


図 2. 記憶プロセスに伴うスパイクの持つ情報量の変化

各脳領域での 1 回のスパイクがすくみ反応の有無について持つ情報量の異なる行動課題時の相関（各プロットの上三角部分）と変化（各プロットの下三角部分）をカラーコードで示した。BLA：扁桃体基底外側核、LA：扁桃体外側核、CeA：扁桃体中心核、PrL L2/3：前辺縁皮質 2/3 層、PrL L5：前辺縁皮質 5 層、vCA1：腹側海馬 CA1 野、vCA3：腹側海馬 CA3 野、vSub：腹側海馬台、B 基底状態、Cd：恐怖条件付け、Cx：文脈保持、Q1~3：手掛り保持および消去学習、RE:消去保持。

* $p < 0.05$、** $p < 0.01$、 *** $p < 0.001$。

共同研究者・謝辞

本研究を行うにあたり、大阪市立大学大学院医学研究科神経生理学教室の水関健司教授をはじめとする教室員に多大なる支援を頂いた。この場を借りて謝意を表したい。また、組織学的解析を行うにあたっては大阪市立大学大学院医学研究科研究支援プラットフォーム共同実験機器施設の機材を利用させて頂いた。

文　献

1) Wilson MA, McNaughton BL. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. Science. 1994 Jul 29;265(5172):676-9. PMID: 8036517

2) Miyawaki H, Diba K. Regulation of Hippocampal Firing by Network Oscillations during Sleep. Curr Biol. 2016 Apr 4;26(7):893-902. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26972321 DOI: 10.1016/j.cub.2016.02.024

3) Okada S, Igata H, Sakaguchi T, Sasaki T, Ikegaya Y. A new device for the simultaneous recording of cerebral, cardiac, and muscular electrical activity in freely moving rodents. J Pharmacol Sci. 2016 Sep;132(1):105-108. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27430984 DOI: 10.1016/j.jphs.2016.06.001

4) Blair HT, Huynh VK, Vaz VT, Van J, Patel RR, Hiteshi AK, Lee JE, Tarpley JW. Unilateral storage of fear memories by the amygdala. J Neurosci. 2005 Apr 20;25(16):4198-205. PMID: 15843623 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0674-05.2005

5) Pachitariu M, Steinmetz N, Kadir S, Carandini M, Harris KD. Kilosort: realtime spike-sorting for extracellular electrophysiology with hundreds of channels. 2016 Jun 30; bioRxiv DOI: 10.1101/061481

6) Harris KD, Hirase H, Leinekugel X, Henze DA, Buzsáki G. Temporal interaction between single spikes and complex spike bursts in hippocampal pyramidal cells. Neuron. 2001 Oct 11; 32(1):141-9. PMID: 11604145

7) Fee MS, Mitra PP, Kleinfeld D. Automatic sorting of multiple unit neuronal signals in the presence of anisotropic and non-Gaussian variability. J Neurosci Methods. 1996 Nov;69(2):175-88. PMID: 8946321 DOI: 10.1016/S0165-0270(96)00050-7

8) Skaggs WE1, McNaughton BL, Wilson MA, Barnes CA. Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. Hippocampus. 1996;6(2):149-72. PMID: 8797016 DOI: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:2<149::AID-HIPO6>3.0.CO;2-K